

Uso do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* como fungicida alternativo para agricultura natural**Use of *Tabernaemontana catharinensis* extract as an alternative fungicide for natural agriculture**

DOI:10.34117/bjdv6n7-213

Recebimento dos originais: 09/06/2020

Aceitação para publicação: 09/07/2020

Felipe Ketzer

Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal de Santa Maria
Instituição: Instituto Federal Farroupilha – Campus Panambi
Endereço: Rua Erechim, 860 - Bairro Planalto, Panambi – RS, Brasil
E-mail: felipe.ketzer@iffarroupilha.edu.br

Abel Bemvenuti

Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituição: Instituto Federal Farroupilha – Campus Panambi
Endereço: Rua Erechim, 860 - Bairro Planalto, Panambi – RS, Brasil
E-mail: abel.bemvenuti@iffarroupilha.edu.br

Samara Veiverberg

Discente do Curso Técnico em Química do Instituto Federal Farroupilha
Instituição: Instituto Federal Farroupilha - Campus Panambi
Endereço: Rua Erechim, 860 - Bairro Planalto, Panambi – RS, Brasil
E-mail: veiverbergsamara@gmail.com

Matheus Giesel Dörr

Discente do Curso Técnico em Química do Instituto Federal Farroupilha
Instituição: Instituto Federal Farroupilha - Campus Panambi
Endereço: Rua Erechim, 860 - Bairro Planalto, Panambi – RS, Brasil
E-mail: matheusdorr1@gmail.com

Maria Eduarda Schmidt

Discente do Curso Técnico em Química do Instituto Federal Farroupilha
Instituição: Instituto Federal Farroupilha - Campus Panambi
Endereço: Rua Erechim, 860 - Bairro Planalto, Panambi – RS, Brasil
E-mail: mariaeschmidt@hotmail.com

RESUMO

O presente trabalho apresenta conteúdo referente a um projeto de pesquisa em desenvolvimento, originado na Prática Profissional Integrada (PPI) do curso Técnico em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, *Campus* Panambi. A proposta consiste na adoção de um método alternativo ao controle químico de pragas, as quais provocam problemas recorrentes no cultivo de plantas alimentícias por pequenos produtores da região, especialmente associadas à

presença de mofo. O controle químico de pragas com agrotóxicos sempre se mostrou muito eficiente. Porém, alguns agrotóxicos são de alto custo ou de alta toxicidade, trazendo possível contaminação ambiental ou moléstias para seres vivos. Sendo assim, iniciaram-se pesquisas buscando a elaboração de um biopesticida eficaz contra os agentes microbiológicos, em especial os fungos, cuja utilização fosse prática e viável em pequenas plantações, reduzindo o custo de produção e toxicidade. Desta maneira, foi proposto o uso da *Tabernaemontana catharinensis*, uma planta comum na região, tendo como ponto de partida o conhecimento popular que a circunda quando utilizada na forma extrato alcoólico. Meios de cultura foram inoculados com alguns fungos, e foram avaliados extratos da casca e das folhas da planta, em diferentes concentrações. Os resultados obtidos até o momento indicam que, ainda que os extratos não tenham apresentado eficácia em todas as amostras, em alguns casos houve potencial inibição no crescimento de fungos. Com base nestes resultados, a pesquisa continuará para adequar o extrato à ação antifúngica mais eficiente, a partir de testes laboratoriais complementares e, posteriormente, de testes em campo. Assim, será possível propor a elaboração de um biopesticida de maneira simples, como alternativa menos danosa ao meio ambiente e aos seres vivos.

Palavras-chave: Cobrina, Jasmim, Leiteira de Dois Irmãos, Casca de Cobra, Fungicida, Biopesticida

ABSTRACT

This work presents content related to a research project under development, originated in Integrated Professional Practice (IPP) of the Technical Course in Chemistry of the Federal Institute of Education, Science and Technology Farroupilha, *Campus* Panambi. The proposal consists in the adoption of an alternative method to chemical pest control, which causes recurrent problems in the cultivation of food plants by small producers in the region, especially associated with the presence of mold. Chemical pest control with pesticides has always proved to be very efficient. However, some pesticides are of high cost or high toxicity, bringing possible environmental contamination or diseases to living beings. Therefore, research was started seeking the development of an effective biopesticide against microbiological agents, especially fungi, whose use was practical and viable in small plantations, reducing the cost of production and toxicity. Thus, it was proposed to use *Tabernaemontana catharinensis*, a common plant in the region, having as a starting point the popular knowledge that surrounds it when used in the form of alcoholic extract. Culture medium were inoculated with some fungi, and extracts from the bark and the leaves of the plant were evaluated in different concentrations. The results obtained so far indicate that, although the extracts were not effective in all samples, there has been inhibition in the growth of fungi. Based on these results, the research will continue to adapt the extract to the most efficient antifungal action, based on complementary laboratory tests and, later, field tests. Thus, it will be possible to propose the preparation of a biopesticide in a simple way, as a less harmful alternative to the environment and living beings.

Keywords: Cobrina, Jasmine, Milkweed, Snake Skin, Fungicide, Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos sintéticos de natureza química no controle de pragas é o método mais utilizado por produtores, tendo em vista que plantas de fácil cultivo, como hortaliças em geral, são muito vulneráveis a agentes fitopatogênicos diversos. Essa medida é eficiente, garante a

produtividade e torna viável a produção. Na mesorregião onde o Instituto Federal Farroupilha *Campus* Panambi está inserido – noroeste do Rio Grande do Sul – existem notáveis problemas relacionados a culturas alimentícias em geral por conta do mofo, cuja proliferação, principalmente em hortaliças, é sustentada por conta do clima úmido. Num nível global, os fungos são responsáveis por 70 a 80% dos prejuízos na agricultura por microrganismos. Desta maneira, diversas práticas de cultura e fungicidas sintéticos são adotados no controle de doenças, evitando perdas na produção (Moore *et al.*, 2001; Brent *et al.*, 2007).

Diversos compostos vêm sendo utilizados nesse sentido, como compostos a base de enxofre ou de cobre, além de elicitadores naturais como a Quitosana e Milsana, cuja eficiência ainda não foi totalmente comprovada. Os fungicidas mais eficazes são os compostos cuja formulação envolve a presença de cobre ou enxofre, especialmente em sistemas orgânicos de produção. No entanto, o uso excessivo destes compostos pode ter efeitos tóxicos em outros organismos vivos, além de causar efeitos no meio ambiente. Também tem surgido um grande número de fungicidas sintéticos, principalmente com ação sistêmica e muito mais potentes, acarretando riscos ainda maiores que os produtos mais tradicionais. Assim, é necessário que a preservação ambiental e a segurança alimentar estejam alinhadas ao desenvolvimento de sistemas de produção agrícola baseados no uso sustentável de pesticidas e na exclusão daqueles que têm efeitos colaterais inaceitáveis (Kristl *et al.*, 2019; Brent *et al.*, 2007).

Com base nestas considerações, foram avaliadas alternativas de utilização e aplicação de preparações naturais derivadas de fontes botânicas da região. Iniciou-se um projeto de pesquisa cujo foco tem sido a produção de um simples e seguro extrato alcoólico de plantas, cuja confecção pode ser efetuada pelo próprio produtor, em geral pequeno agricultor. A ideia é que este extrato seja capaz de eliminar ou reduzir os efeitos dos agentes microbiológicos, em especial os fungos, sem acarretar danos maiores à vida ou ao meio ambiente.

Este trabalho propõe a utilização da planta *Tabernaemontana catharinensis* A.DC (Apocynaceae) (Figura 1) para a produção de extrato natural. A planta é popularmente conhecida como ‘cobrina’, ‘jasmim pipoca’, ‘jasmim catavento’, ‘leiteira de dois irmãos’, ‘casca de cobra’ ou ‘leiteiro de vaca’, e está presente em países como Argentina, Uruguai, Paraguai e em vários estados do Brasil, sendo mais comum na Região Sul (Giehl, 2020; Tropicós, 2020).

Figura 1 – *Tabernaemontana catharinensis*

Fonte: autores (2019)

De acordo com Gonçalves (2011, p. 15), as espécies do gênero *Tabernaemontana* estão associadas à bioprodução de triterpenos – usados em fitoterápicos, compostos vitamínicos e inseticidas – e alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos. Estes alcaloides do tipo indólico monoterpênicos são responsáveis pela maioria das atividades farmacológicas relacionadas com o gênero, das quais pode-se destacar: antileishmaniose, antibacteriana, antitumoral, hipoglicemiantes, analgésicos, antiacetilcolinesterase, entre outros.

Na medicina popular, a *T. catharinensis* é utilizada no tratamento de vários distúrbios, como antídoto para peçonha de cobra, alívio de dor de dente, vermífugo, agente de eliminação de verrugas e composto anti-inflamatório. Em laboratório, substâncias isoladas da planta mostraram atividades de inativação de peçonha de cascavel, antitumoral, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória (Brum *et al.*, 2016; Menecucci *et al.*, 2019).

A *T. catharinensis* também já apresentou atividades antifúngicas, conforme relatos apresentados na literatura. Frações retiradas do extrato etanólico das folhas mostraram atividade contra as linhagens de fungos *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus*. O extrato etanólico da casca da raiz foi ativo contra cepas de *Trichophyton rubrum*. Partes aéreas e extratos etanólicos da casca também apresentaram atividade contra *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum* (Silveira *et al.*, 2017).

É possível acrescentar que, segundo um estudo toxicológico mediado por Brum *et al.* (2016) feito com camundongos, a toxicidade da *T. catharinensis* é apontada como leve, possuindo a DL_{50} estimada entre 2000 - 5000 mg/kg. O baixo risco de danos aos seres vivos, por parte da planta, é um fator determinante para se alcançar o objetivo desta pesquisa. Esta característica, aliada ao baixo

custo de produção do extrato da planta, será capaz de prover aos pequenos produtores o uso de um controle mais seguro dos agentes fitopatogênicos, principalmente na agricultura orgânica.

Sendo assim, este estudo pretende apresentar os resultados preliminares da avaliação da eficiência de extratos da casca e da folha da planta *T. catharinensis* no combate a fungos que atacam culturas alimentícias em geral. O etanol foi utilizado como solvente e diferentes concentrações de extrato foram testadas em culturas desenvolvidas em laboratório. O projeto tem como contribuições o desenvolvimento de um biopesticida de fácil preparo, além de estimular o estudo das propriedades químicas e medicinais desta planta com grande potencial, favorecendo a conservação da espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados nos laboratórios de Química e de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, *Campus* Panambi. Em um primeiro momento, foram produzidos dois extratos alcoólicos, sendo um a partir das folhas e outro a partir da casca da *T. catharinensis*, utilizando o álcool etílico como solvente. Os materiais de laboratório utilizados foram uma balança analítica, um micro moinho de facas (Marconi MA630/1), além de béquer e erlenmeyer de 250 mL. Os materiais reagentes foram folhas, cascas de *T. catharinensis* e álcool etílico com 96°GL. Iniciando o procedimento, pesaram-se aproximadamente 3 gramas de folhas em uma balança analítica. Em seguida, o micromoinho de facas foi utilizado para reduzir o tamanho das folhas (Figura 2), com o objetivo de aumentar a superfície de contato e a eficiência da extração pelo solvente. As folhas moídas foram adicionadas a um erlenmeyer de 250 mL e misturadas a aproximadamente 250 mL de etanol 96°GL. De maneira análoga, o extrato a partir da casca foi elaborado.

Figura 2 – Micro moinho de facas utilizado na redução de tamanho das folhas (esquerda) e folhas após a redução de tamanho (direita)



Fonte: autores (2019)

Na sequência, a prática se voltou para a inoculação de placas de Petri, as quais continham, previamente, um meio de cultura (Sabouraud Dextrose Agar), permitindo a proliferação de tais microrganismos. Para tal procedimento, foi recolhido e higienizado material biológico proveniente de seis plantas diferentes com suspeitas de lesões provocadas por fungos, sendo estas: *Psidium cattleianum* (Araçá), *Zea mays* (Milho), *Eugenia uniflora* (Pitangueira), *Prunus domestica* (Ameixeira), *Hibiscus rosa-sinensis* (Hibisco) e *Melissa officinalis* (Erva cidreira). No laboratório, os materiais utilizados foram a capela, luvas, tesoura e pinça, previamente esterilizadas com álcool 70°GL, além de uma lamparina. Dentro da capela, com a lamparina acesa para manter o ambiente estéril, foi utilizada a tesoura para cortar, na planta, a parte infectada e, com a pinça, colocar o material biológico na placa de Petri. O procedimento foi realizado com todas as amostras de plantas, totalizando vinte unidades inoculadas.

A análise dessas placas de Petri mostrou que em todas ocorreu o desenvolvimento de fungos, sendo que em cinco delas, em determinados locais das placas, a proliferação dos fungos partia, visualmente, da lesão existente na planta. Sendo assim, as placas foram identificadas, e utilizadas para dar prosseguimento às práticas. Então, o objetivo passou a ser identificar os efeitos dos extratos sobre o crescimento dos fungos. Adotando a mesma metodologia, foram preparadas 38 novas placas de Petri, já contendo o meio de cultura (Sabouraud Dextrose Agar), com o auxílio de alça de inoculação, da pipeta de Pasteur, da capela, da lamparina e de luvas. Os materiais reagentes utilizados foram o extrato da folha de cobra, o extrato da casca de cobra e amostras de fungos.

Foram adicionadas na placa de Petri, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, algumas gotas de extrato e, dentro da capela, com uma alça de inoculação, foi retirada uma amostra de fungo e inoculada tal placa de Petri, no lado oposto àquele em que foi colocado o extrato. O procedimento foi realizado nas 38 placas, alternando a amostra da qual o fungo era proveniente, o tipo e a quantidade de extrato. O material também foi analisado por microscópio ótico, com o auxílio de alça de inoculação e lâminas. Com a alça de inoculação, colocaram-se, em cinco lâminas diferentes, cinco amostras de fungos, as quais foram observadas na lente objetiva com aumento de 40x.

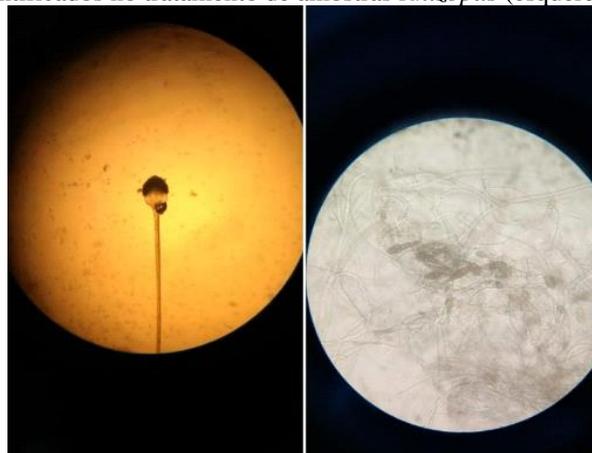
Em um segundo momento, o foco dos procedimentos voltou-se para a modificação dos extratos produzidos. Nesse sentido, procurou-se realizar a concentração dos extratos para avaliar seu poder antifúngico nessas condições. Desta maneira, foi utilizado um evaporador a vácuo para a remoção do solvente. Aproximadamente 50 mL de cada extrato foram colocados em um balão volumétrico de fundo redondo, acoplado a uma bomba de vácuo, estando o equipamento a uma pressão de 460 mmHg. A evaporação do etanol presente nos extratos ocorreu entre 55°C e 57°C, por aproximadamente 30 minutos.

Então, foram feitas novas inoculações utilizando 18 placas de Petri, todas contendo o meio de cultura (Sabouraud Dextrose Agar). Em 2 placas foi colocado apenas etanol 96°GL. Em 4 placas, não foi colocado nenhum material. Em 3 placas foi colocado extrato concentrado da casca e em outras 3, extrato concentrado da folha de cobrina. Por fim, em 3 placas foi colocado extrato não concentrado da casca e em outras 3, extrato não concentrado da folha de *T. catharinensis*, totalizando as 18 amostras. Após alguns dias de repouso à temperatura ambiente, todas as 18 placas de Petri foram inoculadas, colocando-se a amostra do fungo no centro de cada placa de Petri. Tais amostras de fungo utilizadas foram provenientes de uma mesma placa de Petri em função de apresentar, visualmente, uma proliferação homogênea dos microrganismos, sem indícios de contaminação. Considerando a mesma metodologia utilizada anteriormente, foram inoculadas 20 placas de Petri, onde 2 placas continham apenas o meio de cultura, 2 placas continham etanol 96°GL, 5 placas continham extrato de folha não concentrado, 4 placas continham extrato de folha concentrado, 4 placas continham extrato de casca não concentrado e 3 placas continham extrato de casca concentrado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a observação das estruturas de frutificação das amostras, em microscópio óptico, foi possível a distinção de dois fungos, o *Rhizopus* (causador de bolor, às vezes parasita) e o *Alternaria* (causador de moléstias em plantas e alergias em humanos), como mostrado na Figura 2 (Ribeiro 2003; Muniz 2018).

Figura 2 – Fungos identificados no tratamento de amostras *Rhizopus* (esquerda) e *Alternaria* (direita)



Fonte: autores (2019)

A partir das práticas iniciais, verificou-se a proliferação dos fungos em todas as placas de Petri que foram inoculadas, consolidando o primeiro objetivo da pesquisa, como é possível observar-se

na Figura 3 (esquerda). Já em relação à capacidade de inibição de crescimento dos fungos por parte dos extratos, observaram-se em algumas placas resultados positivos, onde, visualmente, a proliferação de tais microrganismos era freada pela presença do extrato. Já em outras, resultados não assertivos, devido à proliferação ter se espalhado por toda a extensão da placa. Entretanto, de acordo com observações feitas em relação à testes mais recentes, onde a metodologia foi, em partes, destoante daquela usada inicialmente, foi possível contemplar que o crescimento fúngico se mostrou diminuído frente à presença do extrato de casca, como nota-se na Figura 3 (direita).

Figura 3 – Inoculação da Amostra 5 (esquerda); Baixa taxa de crescimento no teste com *Alternaria* (direita)



Fonte: autores (2019)

Sendo assim, a partir dos testes realizados até o momento, não é possível comprovar a total eficácia dos extratos produzidos, bem como qual extrato se apresenta de maneira mais eficiente ou qual a quantidade e concentração de extrato ideal para a completa inibição. No entanto, é possível identificar que existe um potencial princípio ativo na *T. catharinensis* em relação à inibição de tais microrganismos. Com a observação e análise das placas, foi possível quantificar os resultados em números e dados, colocados na Tabela 1. Verifica-se que, embora o etanol tenha um efeito positivo na inibição por si só, a presença da folha e da casca (na forma de extrato), especialmente nas condições de concentração dos extratos, foi muito interessante, evidenciando o potencial do material e indicando novos caminhos de pesquisa, especialmente em relação à concentração dos extratos e a testes em plantas em condições ambientais.

Tabela 1 – Área absoluta e percentual ocupada pelo fungo de acordo com cada metodologia proposta no teste com *Alternaria*.

Metodologias	Área (mm ²)	% da área das Placas
Controle Negativo	3136,29	44,24
Controle Negativo + Etanol (1,5mL)	413,31	5,83
Extrato Folha (1,5mL)	86,98	1,22
Extrato Folha (2mL)	123,50	1,74
Extrato Casca (1,5mL)	159,04	2,24
Extrato Casca (2mL)	0	0
Extrato Folha Conc. (1,5mL)	130,55	1,09
Extrato Folha Conc. (2mL)	0	0
Extrato Casca Conc. (2mL)	0	0

4 CONCLUSÕES

O trabalho buscou avaliar a eficiência de um fungicida natural a ser utilizado na agricultura. As premissas do trabalho previam o uso de técnicas simples, utilizando reagentes de fácil acesso e produtos naturais disponíveis. Nesse sentido, cascas e folhas da planta *Tabernaemontana catharinensis*, comum na região, foram utilizadas na obtenção de um extrato alcoólico de simples preparo, manuseio e aplicação. Até a etapa atual de execução do projeto, foi possível concluir que os extratos produzidos ainda não apresentaram eficácia em todas as amostras, mas notou-se inibição do crescimento de fungo. No entanto, as práticas deste trabalho terão continuidade com o objetivo de chegar a resultados mais amplos e técnicas mais assertivas. Além da modificação das concentrações, o tipo de solvente será alterado e testes serão realizados, assim que possível, em plantas nas condições ambientais. Assim como as práticas, as pesquisas terão continuidade, focando nas propriedades da *T. catharinensis*, visando o uso adequado dos extratos, sem causar danos ao meio ambiente, assim como à saúde humana.

REFERÊNCIAS

BRENT, K.J., & HOLLOMON, D.W. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed? Brussels: **Croplife International** 2007 2a Ed. p. 3-7.

BRUM, E.S.; MOREIRA, L.R.; SILVA, A.R.H.; BOLIGON, A.A.; CARVALHO, F.B.; ATHAYDE, M.L.; BRANDÃO, R.; OLIVEIRA, S.M. *Tabernaemontana catharinensis ethyl acetate fraction presents antinociceptive activity without causing toxicological effects in mice. Journal of Ethnopharmacology*.v.191,(2016),p.115124;<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.036>

GIEHL, E.L.H. (coordenador) 2020. *Tabernaemontana catharinensis*. **Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. URL: https://floradigital.ufsc.br/open_sp.php?img=9

GONÇALVES, M.S. *Constituintes Químicos da “Tabernaemontana catharinensis” (Apocynaceae)*. 2011. 273p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

KRISTL, J.; SEM, V.; KRISTL, M.; KRAMBERGER, B.; LESNIK, M. *Effects of integrated and organic pest management with copper and copper-free preparations on tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) fruit yield, disease incidence and quality*. **Food Chemistry**. v. 278, (2019) p. 342–349; <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.079>

MENECUCCI, C.S.; MUCCELLINI, K.L.; OLIVEIRA, M.M.; HIGASHI, B.; ALMEIDA, T.R.; PORTO, C.; PILAU, E.J.; GONÇALVES, J.E.; GONÇALVES, R.A.C.; OLIVEIRA, A.J.B. Latex from *Tabernaemontana catharinensis* (A. DC)—Apocynaceae: Na alternative for the sustainable production of biologically active compounds. **Industrial Crops & Products**. v. 129, (2019), p. 74–84; <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.036>

MOORE, D.; ROBSON, G.D.; TRINCI, A.P.J. (2000). Fungi as pathogens of plants. In **21st Century Guidebook to Fungi** (pp. 367-391). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511977022>

MUNIZ, P. H. P. C.; MARQUES, M. G.; PEIXOTO, G. H. S.; SIMÃO, K. G.; CARVALHO, D. D. C. Caracterização morfológica de *Alternaria alternata* associado a sementes de alface americana cv. ‘Astra’. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 1, p. 82-86, jan./mar. 2018. ISSN 2358-6303

RIBEIRO, S.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasil. Bot.**, V.26, n.2, p.223-229, jun. 2003

SILVEIRA, D.; FELIPE DE MELO, A.M.M.; MAGALHÃES, P.O.; FONSECA-BAZZO, Y.M. *Tabernaemontana* Species: Promising Sources of New Useful Drugs. In: ATTA-UR-RAHMAN **Studies in Natural Products Chemistry**, vol. 54, Elsevier, Amsterdam – Netherlands (2017) p. 227-289; <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63929-5.09990-3>

Tropicos.org. «*Tabernaemontana catharinensis*» **Missouri Botanical Garden**. Visitada em 18 de Junho de 2020 <<http://www.tropicos.org/Name/1800579>>